

Parasitología molecular

MICROBIOLOGÍA

Análisis proteómico de *Renifer heterocoelium* Travassos, 1921 (Trematoda: Plagiorchiida)

Carolina Lenis¹, Manuel Sánchez Del Pino², Luz Valero², Rafael Toledo³, Antonio Marcilla³

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Unidad de Proteómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, España

³ Área de Parasitología, Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia, España

Introducción. Los avances en técnicas de proteómica han permitido la caracterización de diferentes proteínas implicadas en la interacción trematodo-huésped en especies como *Echinostoma caproni*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* y *Paragonimus westermani*. El trematodo *Renifer heterocoelium* se ha descrito como un parásito de importancia veterinaria en los ofidios de Colombia y su análisis proteómico permitiría estudios comparativos con trematodos de importancia médica. El presente estudio inicia la identificación y caracterización de proteínas de *R. heterocoelium* que pudieran participar en la interacción con su huésped.

Materiales y métodos. Los parásitos adultos se sometieron a dos tratamientos consecutivos con tripsina, lo que permitió obtener un material superficial del tegumento y, posteriormente, un lisado somático. Los péptidos obtenidos se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, y se identificaron mediante los motores de búsqueda MASCOT (Matrix-Science) y ProteinPilot software v.2.0.1 (Applied Biosystems).

Resultados. El proteoma de *R. heterocoelium* consta de 990 proteínas, de las cuales se identificó un total de 50 proteínas tipo, 21 de ellas en tegumento y 29 proteínas adicionales en el lisado somático del parásito. Se identificaron proteínas que participan en procesos como: establecimiento de la infección, estrés oxidativo, regulación de estrés celular y unión de plasminógeno, y que resultaron ser homólogas a las descritas previamente en otros trematodos, como *S. mansoni*, *S. japonicum*, *E. caproni*, *C. sinensis*, *F. hepatica* y *P. westermani*.

Las proteínas que parecen ser importantes en la interacción trematodo-ofidio, fueron actina, aldolasa, enolasa, GAPDH, HSP70, taurociamina quinasa, y glutatión S transferasa,

Conclusiones. La comparación de los proteomas obtenidos ha permitido identificar posibles proteínas que pueden ser analizadas, por su papel en la interacción con el huésped ofidio, de manera similar a lo que se ha hecho con otros trematodos. Financiación. Proyectos SAF2010-16263 del Ministerio de Ciencia e Innovación (España) y FEDER; PROMETEO/2009/081 de la Conselleria de Educación de la Generalitat Valenciana y UV-AE-10-23739 de la Universitat de València, Valencia, España.

• • •

Caracterización estructural de la proteína Rv3586 de *Mycobacterium tuberculosis* implicada en la reparación del ADN micobacteriano

Diana María Zuluaga, Nelson Enrique Arenas
Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas,
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas en toda la historia de la humanidad; su infección es producida por un bacilo llamado *Mycobacterium tuberculosis* y es una de las enfermedades de más fácil contagio debido a su resistencia. La importancia del conocimiento de la proteína DisA radica principalmente en la interpretación de las interacciones en el medio micobacteriano para poder crear instrumentos y medios que puedan combatir la enfermedad mediante el entendimiento pleno de sus funciones como actor en el proceso de reparación del ADN micobacteriano.

Metodología. Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína Rv3586, con el fin de establecer una estructura 3D por medio del servidor SWISS MODEL. El modelo se validó utilizando la herramienta PROCHECK. Las interacciones y la caracterización estructural de la proteína se hicieron con el programa Chimera.

Resultados. Los análisis en el modelo 3D permitieron establecer que la proteína DisA pertenece a la familia de proteínas G, forma un octámero, es

hidrosoluble, actúa directamente en el citoplasma de la célula y está directamente relacionada con la producción de cAMP (adenosín 3'5'monofosfato cíclico). Éste es un importante mensajero celular que suele activarse ante estímulos internos o externos, como las hormonas, o por una respuesta de regulación postransducción, lo que confirma la actuación de la DisA en el proceso de reparación del ADN micobacteriano.

Conclusiones. Se ha demostrado que la relación directa entre DisA y cAMP tiene implicaciones más allá de la capacidad funcional de la proteína y está relacionada con la reparación de los daños del ADN micobacteriano.

• • •

Comparative genomics of twenty-two pathogenic protozoa

Diogo Tschoeke^{1,2}, Rodrigo Jardim^{1,2}, Rafael Cuadrat^{1,2}, Marta Mattoso³, Alberto M. R. Dávila^{1,2}

¹ Pólo de Biologia Computacional e Sistemas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

² Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

³ COPPE/PESC, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction. Protozoa is the common name given to unicellular eukaryotes organisms, showing an extremely diversity. Comparative studies among Protozoa can help to identify and study their homologous genes (orthologs and paralogs) and can help to discover genes shared between these species, and the specific to each organism, improving our knowledge.

Materials and methods. After protein redundancy removal with cd-hit of *Plasmodium*, *Entamoeba*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Giardia*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Trichomonas* and *Cryptosporidium* species, totalizing 204,624 proteins in 22 proteomes, were submitted to the program OrthoMCL and OrthoSearch to infer the relationship between these proteins.

Results. OrthoMCL generated 26,101 homologs groups (4,982 paralogs and 21,119 orthologs), of these, 348 groups of orthologous proteins are shared by all the 22 organisms analyzed. Most of them, representing the proteome core of Protozoa, belong to the functional category called "J" (Translation, ribosomal structure and biogenesis) according to Eukaryote Orthologous Groups (KOG/NCBI), followed by the categories "O" (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones) and "A" (RNA processing and modification), which is in agreement with the literature, where orthologous

genes common to all sequenced species were mapped, and called Universal Orthologous Genes. In this analysis we found 29/36 (80,6%) Universal Orthologous Genes with OrthoMCL and 31/36 (81,6%) with OrthoSearch. Similarity analysis of core (348 orthologous proteins) against prokaryote and eukaryote orthologous groups showed that core is 86,8% more similar to eukaryote groups, 12,4% to prokaryote and 0,8% is equally similar to both. OrthoSearch found 337 groups of orthologous proteins shared by all the 22 organisms when used eukaryote groups to generate the Hidden Markov Models and 316 when used prokaryote groups, and 2978/4852 (61,38%) eukaryote groups was used, while prokaryote used 2615/4873 (53,66%).

Conclusions. 302 core genes, are more similar to eukaryotes, and are involved in translation. Now, we are performing phylogenomics analysis in order to obtain a more complete protozoan species tree.

Support. CNPq, CAPES, FAPERJ, FINEP, FIOCRUZ.

• • •

3D interactome of five protozoa

Jorge L. S. Pina^{1,2}, Diogo Tschoeke^{1,3}, Francisco Brasileiro⁴, Alberto Dávila^{1,3}, Floriano P. Silva Jr^{1,3}

¹ Pólo de Biologia Computacional e Sistemas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

² Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

³ Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Laboratório de Sistemas Distribuídos, Universidade Federal de Campina Grande, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction. Cells are a very crowded environment where protein-protein interactions are crucial for performing essential biochemical activities and accurately regulating the many biological networks. As a strategy to discover novel targets for drug and vaccine development, we propose an analysis pipeline aiming to get the 3D protein interactome of five protozoans represented in ProtozoaDB database.

Materials and methods. We will construct 3D models for each protozoan protein, which could not be simply retrieved from Protein Data Bank (PDB) but has a homologue in this database, using the ModPipe pipeline. Subsequently, we will submit these protein structures, in pairs, to the volunteer computers through BOINC application, running the docking program Hex.

Results. Psi-Blast against the PDB indicated that near 20% of all proteins in each protozoa proteome could have the 3D structure modeled by the modpipe

pipeline (with at least 30% identity to a template and 100 amino acids in length): 4,488 (21.5%) for *Trypanosoma cruzi*, 1,940 (23.5%) for *Leishmania major*, 1,953 (23.9%) for *Entamoeba histolytica*, 1,352 (23.0%) for *Plasmodium falciparum* and 1,284 (15.0%) for *T. brucei*. After porting the Hex program to the BOINC application, some preliminary jobs were submitted to the Ibercivis server. In a 2.40GHz i5 with 4GB memory, each job was executed in about 50 min. As it is expected that an average of 2,000 protein 3D structures will be gathered per genome, so near 2'000,000 dockings will be distributed over the community.

Conclusions. While this computational experiment could last for 200 years for just one proteome in a single machine, our preliminary results indicate that the same task is expected to be accomplished in 2 to 4 weeks with a few thousand volunteer computers. Currently, our group is engaged in validating a scoring scheme that can discriminate native-like docked protein complexes from spurious complexes formed between non-interacting proteins.

Support. CNPq, CAPES, FAPERJ, FINEP, FIOCRUZ.

• • •

Adaptação de protocolo para determinação de proteínas imunodominantes de *Pythium insidiosum*

Júlia de Souza Silveira Valente¹, Relber Aguiar Gonçalves¹, Daniela Isabel Brayer Pereira¹, Fábio Pereira Leivas Leite¹, Sônia de Ávila Botton², Ana Muñoz Vianna¹, Gabriel Baracy Klafke³

¹ Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

² Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil

³ Universidade Federal do Rio Grande, Porto Alegre, Brasil

Introdução. A pitiose é uma doença granulomatosa causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*. Atinge equinos provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo, caninos com apresentação gastrointestinal e cutânea, bovinos e felinos com doença cutânea e humanos com quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital. Protocolos para a extração de proteínas deste microrganismo são disponíveis, porém com resultados pouco satisfatórios.

Objetivo. Objetivou-se adaptar o protocolo de extração de proteínas recomendado por Chindamporn, *et al.* (2009).

Materiais e métodos. Foram selecionados 16 isolados de *P. insidiosum* oriundos de equinos

doentes na região sul do Rio Grande do Sul e 01 isolado de *P. insidiosum* oriundo de ambiente aquático. As amostras foram cultivadas contendo 150 ml de caldo Sabouraud a 37 °C sob agitação de 130 rpm durante 5 dias. Adicionou-se 300 µl de timerosal ao cultivo. Em seguida, o micélio foi filtrado e macerado em 5 banhos consecutivos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. O produto obtido foi ressuspense em 5 ml de tampão Tris HCl 0,1 M, pH 7.6 com NaCl 0,15 M. Desta suspensão coletou-se 50 µl e adicionou-se 40 µl de tampão para SDS PAGE. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C/10 min, centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e em sequência ao Western blotting. Toda a metodologia descrita acima foi processada no mesmo dia da preparação.

Resultados. Em todos os isolados avaliados foram observadas bandas de proteínas que variaram de 30-90 kDa. Evidenciou-se uma banda com peso molecular em torno de 70-80 KDa que sugere ser uma das proteínas imunodominantes.

Conclusão. O protocolo utilizado mostrou-se eficaz na extração das proteínas de *P. insidiosum* podendo ser utilizado como metodologia padrão para a extração de proteínas deste importante oomiceto.

• • •

Caracterización estructural de la fosfolipasa A de *Mycobacterium tuberculosis*

Katherine Rodríguez-Marín¹, Diego A. Molina², Luz Mary Salazar³, Jorge E. Gómez-Marín¹, Nelson E. Arenas²

¹ GEPAMOL, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

² Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La tuberculosis persiste como una de las enfermedades infecciosas con mayor prevalencia a nivel global y, a pesar de la dilucidación del genoma completo del bacilo tuberculoso desde 1998, actualmente se desconoce acerca de los mecanismos de acción de sus factores virulencia. El objetivo de este trabajo fue hacer una predicción y un análisis funcional de la estructura 3D de la fosfolipasa A (PLA) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Materiales y métodos. Se identificó una secuencia anotada como PLA (Rv2351c) en la base de datos TBDB. La predicción estructural 3D se hizo en el servidor Swiss-Model, empleando como molde la estructura de la fosfatasa ácida A de *Francisella tularensis* (PDB 2D1G). Se hizo una aproximación estructura-función mediante el análisis de la secuencia y el modelo con los servidores y bases de datos SCOP, CDD, Smart, Pfam, Profunc, Disulfind y MtbReg. La visualización y alineamiento estructural se hicieron en el programa Chimera USCF.

Resultados. Se identificó un dominio fosfoesterasa (PF04185) entre los residuos 43 y 423 (E-value 3.10e-127) y una señal para exportación vía Tat en posición 1-25 (E-value 2.40e-01). Se encontraron dos motivos conservados GDXX y seis motivos estructurales posiblemente implicados en la

estabilización de un ión metálico en el centro activo. El modelo tridimensional está constituido por cinco láminas beta, rodeadas de 16 hélices alfa y un sitio catalítico conservado constituido por E-52, N-53, D-341 y E-342 de acuerdo con el análisis comparativo. Los estudios preliminares indican que el gen es inducible bajo el ambiente del fagosoma y se expresa exageradamente en condiciones de abundancia de ácidos grasos, cerámida e inanición.

Conclusiones. La fosfolipasa A se identificó previamente como un factor de virulencia clave en *M. tuberculosis*, dada su capacidad de modular la respuesta inmunitaria del huésped; nuestros resultados sugieren un rol adicional en la nutrición para el bacilo tuberculoso.

• • •